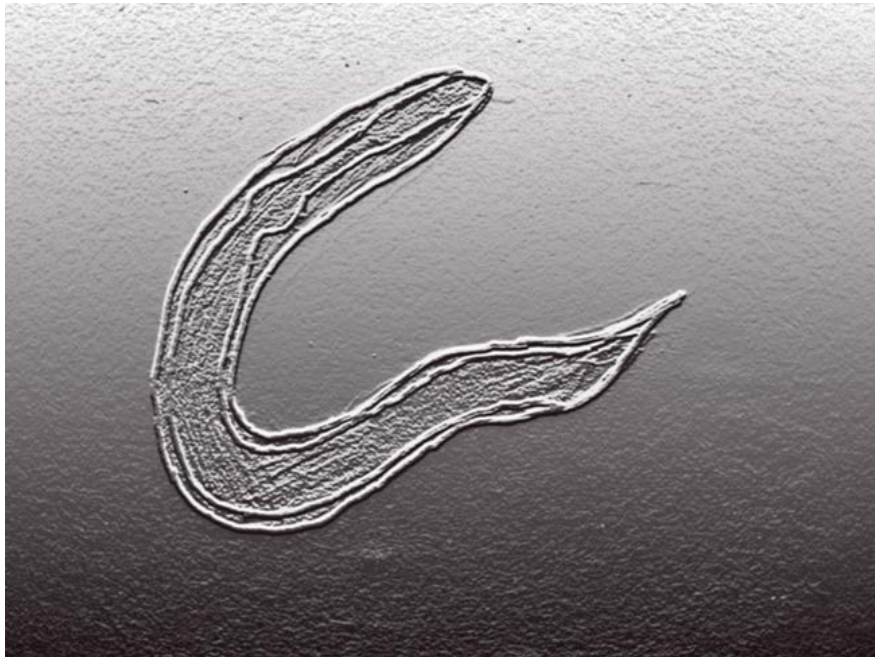


TRABAJO FINAL DE GRADO:

Strongyloides stercoralis:

**Comparación de resultados entre
concentración y PCR anidada en muestras
de pacientes de Guinea Ecuatorial.**



Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud
Pública

Área de Parasitología

Juan José Velacoracho Pérez

Bajo la supervisión del Doctor Antonio Clavel Parrilla

ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción	3
a. Morfología.....	3
b. Ciclo vital.....	4
d. Epidemiología.....	5
d. Factores de riesgo.....	6
e. Patogenia y formas clínicas.....	8
f. Diagnóstico.....	11
g. Tratamiento.....	20
3. Objetivo.....	21
4. Material y métodos.....	21
5. Resultados	22
6. Conclusiones.....	29
7. Bibliografía.....	32
8. Agradecimientos.....	34

Strongyloides stercoralis:

Comparación de resultados entre concentración y PCR anidada en muestras de pacientes de Guinea Ecuatorial.

RESUMEN

Introducción y marco teórico: Actualmente, la estrongiloidiasis es una enfermedad muy infradiagnosticada. Se desconoce la verdadera prevalencia de enfermedad en el mundo por los pocos estudios realizados y porque habitualmente para el diagnóstico del parásito se emplean técnicas de baja sensibilidad como la visión directa y/o la concentración. El hecho de estar infectado y no tener conocimiento de ello, pone al paciente en riesgo de padecer una forma grave de enfermedad (hiperinfección o estrongiloidiasis diseminada) si en algún momento ve comprometida su inmunidad de tipo Th2. Por ello, es muy importante ante la sospecha de enfermedad, la realización de pruebas de alta sensibilidad para la detección del parásito, especialmente si el individuo va a ser sometido a algún tratamiento que pueda comprometer su inmunidad celular como los corticosteroides u otros fármacos inmunosupresores. Las pruebas que se conocen como de alta sensibilidad en la actualidad son la PCR simple, el cultivo en agar y el método de Baermann.

Material y métodos: Se realizó la PCR anidada en 80 muestras de ADN procedente de heces, elegidas al azar de un total de 600 de pacientes procedentes de Guinea Ecuatorial a las que se les había realizado una técnica de concentración en busca del parásito. De estos pacientes se recogieron también en su momento datos de sexo, edad, hábitat, infección por VIH, tratamiento de VIH, grado de inmunosupresión y clínica digestiva.

Resultados: La PCR anidada sólo detectó como positivas 4 muestras de las analizadas mientras que la concentración tuvo un total de 19 positivos. Además no se pudo relacionar significativamente ninguno de los datos recogidos con la infección como factor de riesgo ni como factor protector.

Conclusión: La PCR anidada no se puede emplear como una técnica de alta sensibilidad, al menos con la técnica y los reactivos empleados en este trabajo. En caso de sospecha de estrongiloidiasis o como screening en grupos de riesgo, la prueba más sensible sería la PCR simple y si no se pudiera llevarla a cabo habría que realizar el cultivo en agar o el método de Baermann.

Palabras clave: estrongiloidiasis, *Strongyloides stercoralis*, diagnóstico, PCR.

ABSTRACT

Introduction: Actually strongyloidiasis is a very underdiagnosed disease. The real disease's prevalence is unknown because there are few works about this and currently, the tests used have a low sensitivity as direct view or concentration.

Is very important the fact of being infected and having no knowledge of it, This puts the patient at risk for suffering a severe strongyloidiasis (hyperinfection or disseminated strongyloidiasis) if his Th2 immunity is compromised. Because of this, is very important when there is a high suspicion of infection to do high sensitive tests in order to detect the infection, especially if the individual will be treated with drugs as corticosteroids or other immunosuppressants that may compromise his cellular immunity. The test with best sensitivity for strongyloidiasis is the single PCR followed by agar plate culture and Baermann's method.

Methods: nested PCR was performed in 80 DNA samples extracted from stool samples, picked randomly from a total of 600 samples that belong to Guinean patients. This samples were studied too with the concentration's method. Furthermore we have information about age, sex, habitat, VIH infection, treatment for VIH, degree of immunosuppression and digested symptoms of these patients.

Results: Nested PCR detected only 4 positive samples while concentration detected had 19 positive samples. About the information about patients, we can't relate significantly any datum with the disease as risk or protection factor.

Conclusion: Nested PCR can't be used as a high sensitivity test, at least with the technical used in this work. In case of suspicion of strongyloidiasis or as a kind of screening we should use single PCR, and if we can't use that, we shall use agar plate culture or Baermann's method.

Keywords: strongyloidiasis, *Strongyloides stercoralis*, diagnosis, PCR.

INTRODUCCIÓN

Strongyloides stercoralis es un parásito del ser humano, perteneciente al filo de los nematodos. Dentro de la familia *Strongylidae* y del género *Strongyloides*. Es el agente causal principal de la estrongiloidiasis que se produce cuando este parásito invade e infecta al individuo comenzando a desarrollar su ciclo vital, aunque también se han descrito casos debidos a otras dos especies, *Strongyloides fuelleborni* y *Strongyloides fuelleborni kelly* (Arango, 1998; Centers for Disease Control and Prevention, 2015).

Morfología

Presenta distintas formas o estados mientras completa su ciclo.:

-Hembra adulta: Filiforme, de unos 2,2 mm de longitud. Esófago cilíndrico en el tercio anterior del cuerpo que continúa con el intestino y el ano. Útero donde almacena los huevos que se liberan por la vulva ubicada entre el tercio medio y el distal del parásito. Suele habitar en el duodeno y el yeyuno entre los enterocitos. Normalmente no sobrepasa la capa muscular de la mucosa por lo que no suele encontrarse normalmente en las heces. Se reproducen por partenogénesis, liberando los huevos que se ubican dentro de los tejidos y dan lugar rápidamente a la primera forma larvaria o larva rabadiforme. Se estima que desde la infección se tardan entre

12 y 28 días hasta que se producen los primeros huevos, aproximadamente entre 15 y 60 huevos al día por hembra, que sólo se recuperan de las heces en casos de diarrea muy severa. No suelen encontrarse machos en el ser humano (Arango, 1998).

-Larva rabditiforme: es móvil, con una longitud de unos 250 μm . No tiene capacidad de invadir. Tiene un extremo anterior romo con cavidad bucal corta que lleva al esófago, compuesto por istmo y bulbo y seguido del intestino que desemboca en su extremo posterior en el ano. Por detrás de la mitad del cuerpo un gran primordio genital semilunar. Cuando salen a la luz intestinal, son arrastradas por el contenido digestivo y se convierten en larvas filariformes una vez se encuentran en el medio externo o durante el propio recorrido intestinal (Arango, 1998).

-Larva filariforme: de entre 500 y 700 μm de longitud, es una forma muy móvil y que posee la capacidad de invadir al ser humano. Presenta en su parte anterior un estilete, y carece de cavidad bucal ya que en esta fase la larva no se alimenta. Tiene un esófago largo que llega a la parte media del cuerpo. En su extremo distal hay una muesca. En esta fase del ciclo, depende fuertemente de las condiciones ambientales, ya que sobrevive en el exterior durante 2 semanas con temperaturas entre 8°C y 40°C. Aunque no soporta ni la sequedad ni la humedad elevadas (Arango, 1998).

-Adultos de vida libre: En esta fase encontramos tanto machos como hembras de unos 7 y 10mm de longitud respectivamente. Las hembras poseen huevos en el útero. Los machos en su extremo posterior, que tiene forma curva poseen dos espículas copulatrices. Este ciclo de vida es corto lo que hace que tengan una fecundidad limitada (Arango, 1998).

Ciclo vital

El ciclo vital de este nematodo, que encontramos representado en la **figura 1**, es más complejo que el que presentan otros parásitos de este grupo. Cabe destacar que a diferencia que otros parásitos pertenecientes a este filo posee la capacidad de desarrollar un ciclo de vida libre y otro como parásito y que además tiene potencial de autoinfección y multiplicación dentro del propio hospedador (CDC, 2015).

Ciclo de vida libre: La larva rabditiforme sale con las heces y puede mudar dos veces y convertirse en larva filariforme, que es la forma infectante o hacerlo cuatro veces y dar lugar a los adultos de vida libre que se reproducen y dan lugar a huevos de los cuales nacen larvas rabditiformes, que pueden seguir un nuevo ciclo de vida libre o convertirse en larvas filariformes infectantes que penetren la piel del hospedador humano donde iniciaría el ciclo de vida parasitario (CDC, 2015).

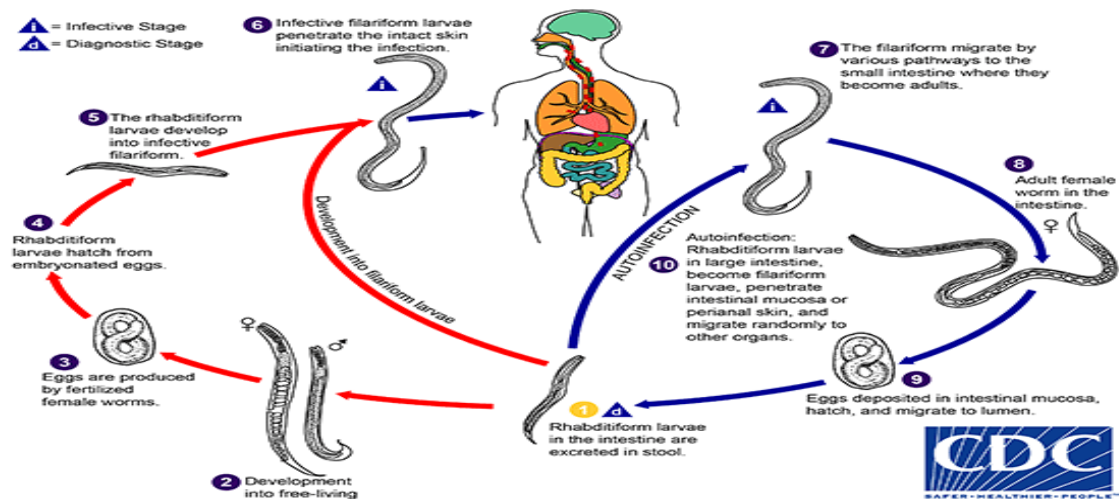


Figura 1 Representación de los ciclos de vida posibles de *Strongyloides stercoralis* (CDC, 2015)

Ciclo de vida parasitario: Las larvas filariformes del suelo contaminado penetran la piel del sujeto y tradicionalmente se ha pensado que por esta vía llegan a los pulmones y se desplazan a través de los bronquios llegando hasta la faringe donde se degluten llegando de este modo al intestino delgado, pero en la actualidad existen evidencias de que estas larvas filariformes son capaces de migrar directamente al intestino a través del tejido conectivo. Aquí mudan dos veces convirtiéndose en adultos femeninos que se insertan en el epitelio y se comienzan a reproducir mediante partenogénesis. Se producen huevos que dan paso a larvas rhabditiformes, las cuales pueden salir con las heces y seguir el ciclo de vida libre o pueden causar una autoinfección, este proceso se lleva a cabo cuando las larvas mudan y se convierten en filariformes que penetran la propia mucosa intestinal (interna) o la piel perianal (externa). En cualquiera de los casos la larva sigue los mismos pasos que en la primoinfección: por el torrente sanguíneo hasta el pulmón, después ascenso a la faringe y acabar llegando al intestino delgado donde madura, o pueden diseminarse ampliamente por el cuerpo dando lugar a la estrongiloidiasis diseminada, especialmente en personas que se encuentran con un nivel de inmunidad más bajo de lo normal (CDC, 2015).

Epidemiología

Se conocen casos de parasitosis por *Strongyloides stercoralis* en África, todo el continente americano, Asia, Europa y Oceanía. Según diversos autores se estima que la prevalencia total de estrongiloidiasis es de entre 30 y 100 millones de sujetos infectados (Centers for disease control and prevention, 2014; Vonghachack et al., 2014).

Se produce más frecuentemente en países de zonas tropicales. En general es una enfermedad más típica de los países subdesarrollados. También se relaciona con el ámbito rural y con los barrios pobres de las ciudades (Schär et al., 2013).

En Europa y EE. UU hay casos aislados en agricultores o mineros, aunque sobre todo es una enfermedad relacionada con los inmigrantes, los turistas y los militares que provienen o regresan de zonas endémicas, lo que muestra la

importancia que podría tener el realizar estudios de screening en estos grupos poblacionales (Schär et al., 2013). En España hay un desconocimiento de la prevalencia exacta pero se piensa que esta subestimada. La mayoría de casos en autóctonos se ha producido en la comunidad Valenciana y en Murcia (Pardo, Rodríguez, & Campillos, 2003). Como comentábamos para toda Europa se relaciona con los trabajos agrícolas sobre todo en marjales o arrozales.

La prevalencia varía mucho según diferentes regiones del mundo. En EE. UU las series de pequeños estudios han demostrado que existe entre un 0 y un 6,1% de habitantes infectados, este porcentaje aumenta mucho si nos centramos en la población inmigrante, donde el límite máximo alcanza el 46,1%. (CDC., 2014) Mediante la revisión hemos recogido datos de prevalencias también en otros países en los que se han llevado a cabo estudios acerca de esta enfermedad. El sudeste asiático se considera una zona endémica, así por ejemplo en Laos se estima que la prevalencia total es alrededor del 20% (Vonghachack et al., 2014) en Tailandia un 23,7%, en Camboya un 17,5% (Schär et al., 2013). En Gabón por ejemplo hay series que hablan de incluso un 98,1% de prevalencia de la infección. También cabe destacar que en Perú se han recogido informaciones en las que se calcula una tasa de infección hasta del 75% y en Brasil un país endémico también una prevalencia de aproximadamente el 13% (Schär et al., 2013). En la **figura 2** podemos observar una representación de la prevalencia en diferentes países según los estudios realizados por los servicios sanitarios.

En general los autores y las fuentes consultadas coinciden en que estos datos son poco más que una mera aproximación a la realidad debido a que existen muy pocos estudios dedicados a este tema y también a que en la mayoría de ellos no se emplean métodos de alta sensibilidad para la realización del diagnóstico.

Se estima que la incidencia de la infección es más elevada en niños que en adultos aunque este segundo grupo presenta una mayor tasa de infección y prevalencia, esto se atribuye al hecho de que muchos de los adultos infectados fueron parasitados durante la niñez (Schär et al., 2013) ya que la infección puede permanecer durante muchos años dentro del hospedador (Arango., 1998). También cabe destacar que la infección es aproximadamente dos veces más frecuente en varones que en mujeres (Vonghachack et al., 2014).

Factores de riesgo

Hay varios factores que favorecen la aparición de la infección y/o su evolución a formas clínicas graves.

·**Infección por VIH:** Es frecuente encontrar coinfección de VIH y *Strongyloides stercoralis*. CDC. (2014) no considera que sea factor de riesgo ni para la adquisición del parásito ni para que el mismo tenga un peor curso clínico (Arango., 1998). Por el contrario Corti et al. (2011) sí que lo relacionó en su estudio con una mayor letalidad y Schär et al. (2015) lo hace con una mayor tasa de infección.

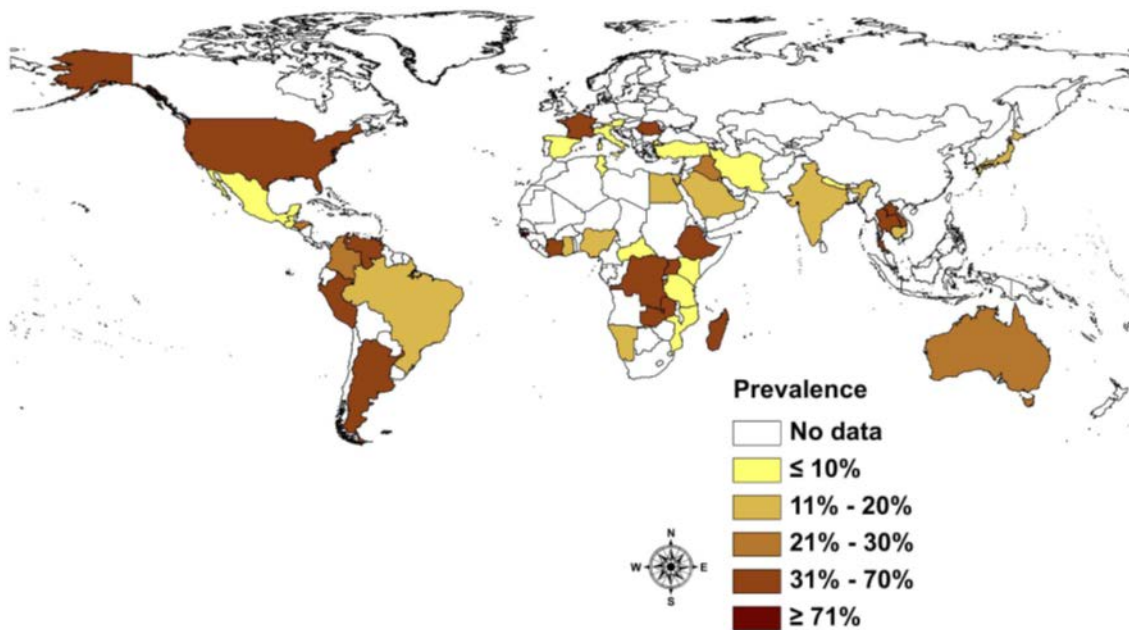


Figura 2: prevalencia de parasitosis por *Strongyloides stercoralis* según servicios sanitarios (Schar et al., 2013).

·Infección por HTLV-1: Aunque no existe tanta co-infección como en el caso anterior, respecto a este virus sí que los autores coinciden en que es un factor de riesgo tanto para una mayor prevalencia de infecciones como para que esta tenga una mayor tasa de evolución a formas clínicas graves (Arango., 1998; Schär et al., 2013; CDC., 2014) . En los individuos coinfectados se evidencia una intensa respuesta inmune de tipo Th1 pero hay una importante disminución en la de tipo Th2 y se encuentran niveles descendidos de IL-4, IL-5, IL-13, IgE y eosinófilos lo que favorece la hiperinfección y la diseminación por este helminto ya que la degranulación de mastocitos y la actividad para destruir al parásito se ven disminuidas. Además el *S. stercoralis* también colabora con la proliferación del virus, promoviendo la proliferación policlonal de células infectadas y puede ser un cofactor para el desarrollo de enfermedades asociadas al virus. Además la coinfección también favorece que el tratamiento para el parásito no sea efectivo (Freites, 2008; Marcos, Terashima, Canales & Gotuzzo, 2010).

·Alcoholismo: el hábito enólico de riesgo también se ha relacionado estadísticamente con el aumento de infecciones por *Strongyloides stercoralis* (Schär et al., 2013).

·El sexo masculino como ya hemos comentado también se relaciona con una tasa de aproximadamente el doble de prevalencia (Vonghachack et al., 2014; Schär et al., 2015).

·Inmunosupresión: se considera un factor de riesgo especialmente para que la infección se convierta en una estrongiloidiasis diseminada, está típicamente relacionado con el tratamiento con corticosteroides pero realmente cualquier situación en la que existe una alteración en la inmunidad celular podría favorecer el desarrollo de una estrongiloidiasis diseminada (Arango, 1998; Rodríguez et al., 1998; Pardo et al., 2003; Schär et al., 2013).

·Trasplantados: se observa una evolución hacia formas graves y frecuentemente fatales de la enfermedad especialmente entre los pacientes que han sido sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos. También se ha registrado que se puede adquirir la infección a través del órgano trasplantado como puede ser un riñón o el intestino delgado (Marcos et al., 2010).

·Hospitalización: en algunas zonas endémicas se ha observado mucha mayor prevalencia en este grupo de población respecto a la población general, aunque más que porque sea un factor de riesgo se piensa que está relacionado con que entre este grupo poblacional es más frecuente el tratamiento inmunosupresor, y a que a estos sujetos se les hace un seguimiento más exhaustivo, usando más muestras para hacer el diagnóstico y a que se usan pruebas con una mayor sensibilidad que en la población que no se encuentra hospitalizada (Schär et al., 2013).

·Zonas pobres y medio rural como ya comentábamos anteriormente son también factores de riesgo para la adquisición del parásito (Schär et al., 2013; Herrera et al., 2006).

·Otros factores que podrían estar relacionados son hábitos o trabajos de alto riesgo para entrar en contacto con las larvas infectantes: andar descalzo, contacto con aguas residuales, trabajo agrícola (CDC., 2014) o el defecar al aire libre (Herrera et al., 2006) o en una letrina en lugar de en un sanitario (Khieu et al., 2014).

Patogenia y formas clínicas

La gravedad, o el nivel de enfermedad y clínica debida a la infección por *Strongyloides stercoralis* se debe a la interacción que realiza el parásito con el sistema inmune del sujeto hospedador. Siempre se había relacionado con la acción de los eosinófilos aunque en los últimos años se ha descubierto que en la respuesta inmune participan también algunos macrófagos y neutrófilos actuando como inmunomoduladores (Hernández-Chavarría, 2001).

Se ha observado que los eosinófilos pueden desencadenar la respuesta inmune primaria actuando como células presentadoras de antígenos, además estos antígenos provocan la activación y el reclutamiento de neutrófilos (Hernández-Chavarría, 2001).

No se conoce bien el mecanismo mediante el cual el sistema inmune acaba matando a las larvas pero se sabe que hay mieloperoxidasas de los neutrófilos y MBPs de los eosinófilos implicadas. Además en la destrucción de las larvas también interviene el componente C3 del complemento (Hernández-Chavarría, 2001).

Recientemente se ha demostrado que la infección por *S. stercoralis* conduce a una vía alternativa de activación de macrófagos que también participan para matar al parásito. No se conoce bien la relación que existe entre la inmunidad innata y la adaptativa en esta parasitosis. Se sabe que los eosinófilos pueden activar linfocitos

antígeno-específicos y con ello estos se diferencian en linfocitos Th2 responsables de actuar contra la infección. Estos linfocitos producen IL-5 que activa los propios eosinófilos y también IL-4 (Hernández-Chavarría, 2001).

En la respuesta adquirida se involucran los linfocitos mencionados anteriormente y también linfocitos B que son los encargados de por acción de los Th2 generar IgG e IgE, además también se han descrito en los pacientes infectados IgA e IgM específicas. Algunos estudios también han demostrado la necesidad para eliminar al parásito de la IL-4 y de la IL-13 (aumenta peristaltismo, favoreciendo la expulsión de larvas) (Hernández-Chavarría, 2001).

Los linfocitos T reguladores son los únicos capaces de modular la respuesta de los propios linfocitos en reacción a los antígenos extraños. También pueden suprimir la respuesta secretando citoquinas antiinflamatorias y consumiendo proinflamatorias. Así, evitan daños colaterales por una respuesta excesiva. Se ha demostrado que los linfocitos Th2 están implicados en el control parasitario en individuos HTVL-1 + que presentan cifras incrementada de Treguladores. Además la propia infección provoca un aumento de estos linfocitos lo que provoca una mala respuesta al romperse el equilibrio. Se ha observado que las cifras de Treguladores son inversas a los niveles de IL-5 que es necesaria para conseguir eliminar al parásito (Hernández-Chavarría, 2001; Barros & Montes, 2014).

También se ha observado un aumento de Treguladores en el tejido intestinal de pacientes infectados, lo que se ha relacionado con una menor cantidad de células que secretan IgE en las zonas cercanas (Barros et al., 2014).

Debido a este mecanismo el parásito provoca en el paciente los diferentes síndromes o cuadros clínicos propios de la estrongiloidiasis:

-Infección aguda: Con la primoinfección se dan sobre todo 3 tipos de afecciones o lesiones en el sujeto hospedador. Normalmente, en pacientes inmunocompetentes la clínica es leve o incluso encontramos que el paciente infectado está completamente asintomático (Barros et al., 2014).

·A nivel cutáneo, las larvas filariformes provocan lesiones al penetrar en el individuo. Este tipo de lesiones también se pueden observar, y en mayor medida alrededor de la zona perineal cuando la infección crónica y comienza un ciclo de autoinfección penetrando por esta región al ser expulsadas y comenzando su ciclo de nuevo.

·También por el paso de las larvas en su ciclo vital a través del pulmón, el paciente puede presentar alguna clínica respiratoria. En pacientes inmunocompetentes este cuadro es leve (Barros et al., 2014). En pacientes inmunocomprometidos con infección masiva puede ser grave y causar muchas microhemorragias intraalveolares que pueden llegar a desembocar en bronconeumonías y cuadros obstructivos (Hernández-Chavarría, 2001).

·Por último cabe mencionar que los individuos parasitados por *S. stercoralis* pueden presentar también algunos síntomas a nivel digestivo provocados por las hembras adultas que se localizan en el intestino. Normalmente se trata de una sintomatología ligera. (Hernández-Chavarría, 2001; Igual & Domínguez, 2007; Barros et al., 2014).

-Infección crónica: Una vez que la parasitosis se establece en el sujeto hospedador decimos que la infección ha cronificado. Esta etapa puede durar décadas, manteniéndose por el ciclo de autoinfección. Hay una parte importante de los pacientes infectados que no presentan síntomas en esta etapa, entre el 32,7% y el 43,3% (Igual et al., 2007). Igual que en la infección aguda, la clínica reside en los órganos por los que pasa *S. stercoralis* a lo largo de su ciclo vital:

Las manifestaciones digestivas más repetidas son las molestias abdominales que pueden comprender dolor, sensación de plenitud, meteorismo, diarrea, prurito anal (Igual et al., 2007) también pueden presentar náuseas, y vómitos (Barros et al., 2014) y pérdida de peso (Hernández-Chavarría, 2001). Estas manifestaciones de tipo digestivo aparecen en entre el 5 y el 75% de los pacientes. . Un 90% de casos presenta eosinofilia en sangre periférica (Barros et al., 2014). Se han descrito también formas severas en las que aparecen ulceraciones en las zonas parasitadas con atrofia de la mucosa e infiltración de las paredes con larvas (Hernández-Chavarría, 2001).

A nivel cutáneo, la lesión característica y que se considera patognomónica es la **larva currens** (figura 3). Es una forma de larva migrans cutánea debida al paso bajo la piel de larvas de *Strongyloides stercoralis* en el curso de un ciclo autoinfección externa (Ano → muslos → tronco). Se trata de una lesión lineal urticariforme, su tracto es serpenteante y además va variando su localización unos 5-10cm/h. Dura entre 12h y 2 días desapareciendo después de forma espontánea. Las lesiones suelen recurrir con el paso de los meses. Según las zonas tiene mayor o menor incidencia dentro de los casos, en Asia alcanza tasas de entre el 30 y el 92% de los casos mientras que en nuestro medio tan sólo se observa en un 2% de los casos. En zonas de poca incidencia de esta lesión aparecen otras más inespecíficas como urticaria o prurito en entre un 30 y un 40% de los casos (Igual et al., 2007).



Figura 3. Lesión cutánea larva currens.
(Bailey, Danylo & Boggild, 2015)

El paso de larvas a través de los pulmones es el causante de las manifestaciones respiratorias en los pacientes infectados por *S. stercoralis*. El síndrome más característico es el **síndrome de Löeffler**, un cuadro respiratorio agudo a veces febril con tos espasmódica, expectoración que puede ser hemoptoica, sibilancias y signos de consolidación pulmonar periférica. Puede cursar con broncoespasmo. Además siempre asocia con una eosinofilia en sangre periférica que suele ser bastante significativa. Aunque normalmente es de corta duración puede progresar a un fallo respiratorio que requiera el empleo de soporte ventilatorio mecánico (Alparo & Tamayo, 2005; Ramírez Arriola, Hamido, Vázquez, Cabezas, & Salas, 2015). Hay otro tipo de manifestaciones que pueden estar asociadas a la infección por el parásito o a otras enfermedades subyacentes como el asma, las sibilancias, la tos o la disnea. Las manifestaciones respiratorias

aparecen según Igual et al. (2007) en un 20% de los casos y además, de esta fracción, la mitad ya tenían problemas respiratorios de base.

Las lesiones que se producen tanto en el aparato respiratorio como en el aparato digestivo pueden provocar infecciones bacterianas graves debido a que las larvas arrastran flora cuando atraviesan los órganos. De este modo pueden cursar con clínica de gravedad importante pudiendo causar sepsis e incluso la muerte (Igual et al., 2007).

Autoinfección: Se emplea este término cuando en algunos pacientes, muchas larvas maduran a lo largo del tracto intestinal convirtiéndose en larvas filariformes L3 que son infectantes. Estas larvas pueden atravesar la pared del intestino realizando el ciclo desde el torrente sanguíneo (endógena) o salir con las heces y penetrar por la piel de la región perianal (exógena) (Barros et al., 2014).

Cuando se da una autoinfección en pacientes con problemas de inmunidad, especialmente de tipo celular como en desnutrición, infectados por el virus HTLV-1, vejez, tratamiento con corticosteroides, alcoholismo o VIH con mal control hay una descompensación de la respuesta inmune que no es suficientemente eficaz y se produce una **hiperinfección**. Se barajan 3 posibles causas para el desarrollo de este cuadro: que la alteración en la inmunidad cause la ausencia de inmunidad frente a *S. stercoralis* rompiéndose el equilibrio entre parásito y hospedador y aumento de la parasitosis; que las circunstancias inmunosupresoras del paciente sean quien por si mismas actúan sobre el nematodo instalado crónicamente y potencien el ciclo y la producción de larvas infectantes; por último se baraja la opción de que la causa sea una combinación de los dos mecanismos anteriormente explicados , (Hernández-Chavarría, 2001; Igual et al., 2007; Barros et al., 2014). A pesar de esto, también se han descrito casos de síndrome de hiperinfección en pacientes sin inmunosupresión (Puthiyakunnon et al., 2014).

Durante la fase de hiperinfección, el parásito se encuentra confinado en los órganos en los que desarrolla su ciclo vital en condiciones normal, es decir: tracto digestivo, pulmones y piel, debido a esto, los signos y síntomas son similares a los que presenta el hospedador durante la infección crónica pero con mayor gravedad (Igual et al., 2007; Barros et al., 2014).

A nivel cutáneo, la *larva currens* es la lesión típica aunque en este contexto, pueden complicarse con lesiones petequiales, purpúricas, vasculitis y otras lesiones propias de la sepsis. Respecto al aparato digestivo la mayoría de casos presentan dolor abdominal y diarrea, aunque también cabe la posibilidad de encontrar signos y/ o síntomas que sugieren mayor gravedad como vómitos, íleo paralítico, obstrucción intestinal (apreciables en el examen radiológico), enteritis o hemorragias intestinales; además este cuadro provoca la aparición de alteraciones indicativas de malnutrición como pueden ser alteraciones del balance hidroelectrolítico o hipoalbuminemia. En las heces hay un gran número de larvas y no es raro que aparezca también sangre. Por último a nivel respiratorio en el paciente hiperinfectado podemos encontrar: infiltrados pulmonares, hemorragias alveolares o *Síndrome de Loeffler* como en la infección crónica y además dolor

pleurítico, hemoptisis, disnea grave e incluso distrés respiratorio que puede causar insuficiencia respiratoria (Igual et al., 2007; Barros et al., 2014).

Acerca de la hiperinfección cabe mencionar por último que no es infrecuente que a diferencia de en la infección crónica el paciente no presente una eosinofilia en sangre periférica. Además en este síndrome, la tasa de mortalidad es elevada (llegando hasta un 85%) (Barros et al., 2014).

Diseminada: en este tipo de pacientes en los que la inmunidad se encuentra alterada, además del síndrome de hiperinfección, el enfermo puede presentar una estrongiloidiasis diseminada. Este cuadro se produce cuando las larvas ya no se encuentran únicamente en órganos que forman parte de su ciclo vital habitual, sino que invaden otras zonas del organismo como el sistema nervioso central, el hígado, el sistema linfático, el tracto urinario y otros (Hernández-Chavarría, 2001; Igual et al., 2007). Aunque al igual que en el síndrome de autoinfección, hay casos descritos de infección diseminada en los cuales no existía ninguna alteración de la inmunidad, sobre todo en áreas donde abunda la población de alto riesgo (Puthiyakunnon et al., 2014).

Esta evolución de la enfermedad puede aparecer dentro de un síndrome de hiperinfección ya establecido, aunque no siempre es así. Las formas más graves de esta parasitosis suelen conllevar complicaciones causadas por infecciones bacterianas ya que al igual que en la infección crónica las perforaciones que provocan las larvas pueden conllevar una migración de bacterias desde el aparato digestivo directamente por las úlceras, o siendo transportadas por las larvas filariformes y provocando septicemias, infecciones del sistema nervioso central, infecciones del tracto urinario, abscesos, etc.... Los agentes etiológicos de estas infecciones pueden ser: *E coli*, *Klebsiella spp*, enterococos, estreptococos intestinales y a veces hongos. Estas infecciones frecuentemente causan la muerte de los pacientes (Hernández-Chavarría, 2001; Igual et al., 2007; Puthiyakunnon et al., 2014).

Los pacientes con estrongiloidiasis diseminada pueden presentar: fiebre, escalofríos, dolor abdominal, distensión abdominal, diarrea, estreñimiento, odinofagia, pérdida de peso, vómitos, anemia, sangrado gastrointestinal, edema, ascitis, alteraciones hidroelectrolíticas, inflamación e infección del tracto gastrointestinal, tos, hemoptisis, broncoespasmo, dolor pleurítico, insuficiencia respiratoria, alcalosis, neumotórax, fibrilación auricular, prurito, petequias, púrpuras, vasculitis, síndrome meníngeo, y fallo multiorgánico (Pérez, Núñez, Martín, Cabrera, & Rodríguez, 2012; Puthiyakunnon et al., 2014).

La estrongiloidiasis diseminada tiene una elevada letalidad, pero no es siempre el desenlace fatal del síndrome de hiperinfección ya que no siempre aparece en el contexto de este síndrome y también porque la hiperinfección puede ser letal por sí misma (Puthiyakunnon et al., 2014).

Los síndromes de hiperinfección por *S. stercoralis* y estrongiloidiasis diseminada son los dos componentes de lo que comúnmente se conoce como **estrongiloidiasis grave**. Este cuadro, se produce en entre un 1,5 y un 2,5 % de los pacientes que presentan una infección crónica por *S. stercoralis*, aunque estas cifras

varían según la zona, en el estudio de Igual et al. (2007), se encontró en una serie en el 5,4% y en otra en el 13%. La mortalidad en estos pacientes es elevada, variando en los diferentes estudios y alcanzando tasas de entre el 30 y el 87% (Igual et al., 2007; Barros et al., 2014).

Diagnóstico:

Existen muchos métodos diferentes mediante los que se puede llegar al diagnóstico de la infección por *S. stercoralis*. A continuación se expone algo acerca de varios de ellos, haciendo especial hincapié en el método de la PCR, ya que es el método del que queremos evaluar la validez en este trabajo.

-Análítica general: como ya se mencionaba cuando hablábamos de la clínica, la estrongiloidiasis causa una serie de alteraciones en los perfiles analíticos que se solicitan habitualmente. En el hemograma, la parasitosis suele causar un aumento de la cantidad de eosinófilos (cuando no es así es factor de mal pronóstico), este aumento es fluctuante por lo que no sirve por sí solo para hacer un seguimiento de la eficacia del tratamiento; en formas diseminadas sobre todo, pueden aparecer anemias de gravedad considerable, presentándose valores de hemoglobina que oscilan alrededor de los 7,5g/dl (3,6-11,1). Esta anemia se asocia a pérdidas ocultas de sangre por las heces. Además de alteraciones del hemograma, en formas severas también se manifiestan en el perfil analítico general: hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipocolesterolemia, malabsorción de glúcidos y también de grasas (Arango, 1998).

-Estudios coproparasitológicos: Dentro de este apartado se engloban muchos métodos diferentes, entre ellos también hay una considerable variabilidad en la sensibilidad.

· **Visión directa:** la sensibilidad varía en función de la de estudios que hagamos en la muestra, variando así desde un 30% cuando realizamos un único estudio coprológico, a 50% en 3 y de un 100% en 7. Aun así no es un buen estudio, especialmente en infecciones de poca gravedad ya que en estos casos el número de larvas por gramo es bastante reducido (Arango, 1998).

· **Método de concentración:** o método clásico del formol éter de Ritchie, en este método se observan las larvas en el sedimento (Arango, 1998). Se trata de un método fundamentado en la concentración y la el centrifugado de una disolución de la muestra original (Martínez, González-Carbajal, Cañete, & Almenarez, 2011). La sensibilidad varía entre 25 y 60% (Campo, Gutiérrez & Cardona, 2014).

· **Método de Baermann:** es un método de separación de larvas que emplea el termotropismo y el hidrotropismo positivo (Martínez et al., 2011). Las heces envueltas en gasa se colocan en un embudo conectado por una fina puntilla a un tubo de ensayo. El agua tiene una temperatura entre 37 y 45 °C (Arango, 1998; Franceschi et al., 2008; Martínez et al., 2011). Tras unos 45 minutos en los que se mantienen las heces suspendidas se lleva a cabo una centrifugación del material recogido en el tubo. Tras este procedimiento se recoge parte del sedimento que nos

queda en el tubo de ensayo y se examina al microscopio donde se encuentran larvas rabditiformes del parásito (Franceschi et al., 2008).

- Método de Harada-Mori: este procedimiento es otro tipo de método de separación de larvas en el cual se emplean en lugar de un embudo, tiras de papel de filtro que se impregnan en su extremo con una pequeña cantidad de heces (Arango, 1998), en la parte que queda más alta dentro del tubo de ensayo, sin contacto con el agua que se deposita dentro de los mismos. Los tubos se guardan y se mantienen durante un período de 48 horas (tiempo variable) a temperatura ambiente. Tras este periodo se abren los tubos y se desechan los papeles, centrifugando el contenido del tubo y descartando el sobrenadante, llevando a cabo el examen del sedimento mediante el microscopio óptico (Franceschi et al., 2008).

- Cultivo en placa de agar: para llevar a cabo este procedimiento se emplea una placa con agar nutritivo al 1,5%. Con esta prueba se pretende que el parásito lleve a cabo su ciclo de vida libre (Arango, 1998). Dentro de las placas se colocan 2-3 gramos de heces y se tapan y sellan. Se incuban a 30 °C (Arango, 1998)-37°C (Franceschi et al., 2008; Martínez et al., 2011) entre 1 (Franceschi et al., 2008; Martínez L et al., 2011) y 2 días (Arango, 1998). Tras este periodo se realiza el examen, en primer lugar macroscópico, observando si habían aparecido los surcos típicos y más tarde microscópico (Arango JH., 1998; Franceschi et al., 2008; Martínez et al., 2011). Es una prueba muy sensible, algunos estudios dicen que similar al método de Baermann (Martínez et al., 2011) y otros que incluso mejor (Arango, 1998; Franceschi et al., 2008), aunque también más cara y que conlleva un riesgo de infección del personal que lleva a cabo la prueba ya que en el cultivo, las larvas rabditiformes pueden convertirse en larvas filariformes con capacidad infectante (Franceschi et al., 2008; Martínez et al., 2011).

De todos los exámenes englobados en el grupo de los coproparasitológicos, el más sensible es el cultivo en placa de agar, seguido del método de Baermann.

El cultivo, presenta una sensibilidad del 89% (86-92%) por 72% (67-76%) que nos ofrece el método de Baermann. Cabe mencionar también que aunque la visión directa en heces y la concentración formol-éter de Ritchie son las pruebas que más se llevan a cabo cuando se hace un estudio en busca de este nematodo en los pacientes, ambos presentan una sensibilidad que limita mucho su validez con este fin. Entre los dos, el examen directo es el que menor sensibilidad ofrece, un 21% (16-26%) mientras que la concentración mejora un poco los resultados aunque no lo suficiente 48% (42-54%). Pero a pesar de esto y de que el cultivo en placa de agar cuenta con la evidencia suficiente como para ser considerada la prueba de elección, ésta se lleva a cabo en muchos menos pacientes debido a los costes, al tiempo que se necesita para obtener resultados y a que se necesita personal preparado para llevarla a cabo (Campo et al., 2014).

En la actualidad, los avances tanto en el campo de la biología molecular como en el de la inmunología han permitido el desarrollo de nuevas técnicas para el diagnóstico de diversas enfermedades y entre ellas de infecciones. En el caso de la estrongiloidiasis, también existen técnicas que emplean anticuerpos y de biología molecular que pueden utilizarse para el diagnóstico de la parasitosis.

-Entre las técnicas basadas en la inmunología se encuentran:

Serología: o detección de anticuerpos. La presencia del parásito en el organismo provoca que aparezcan anticuerpos específicos contra él como ya comentábamos anteriormente. Para tener una buena sensibilidad, los anticuerpos empleados deben ser muy específicos. Dentro de este grupo hay un amplio y diverso abanico de anticuerpos y antígenos que pueden ser detectados (Levenhaghen & Costa-Cruz, 2014).

1. IFAT (Inmunofluorescence antibody test): es una prueba bastante útil en la que se detecta la existencia de anticuerpos del sujeto que se unen a antígenos del parásito para diagnosticar la parasitosis (*Figura 4*). Después se observa la muestra en un microscopio de fluorescencia tras añadir una Ig anti-anticuerpos humanos (Mota-Ferrerira et al., 2009; Levenhaghen et al., 2014). Pero a causa del peligro que supone la manipulación de las larvas de *S. stercoralis* se usan otras especies. Tiene buena sensibilidad y especificidad, además también es útil para valorar la respuesta tras el tratamiento). Además también sirve para trabajos epidemiológicos, por ejemplo para medir que porcentaje de mujeres embarazadas están infectadas por *S. stercoralis* en países donde la infección está muy extendida, ya que en la leche se pueden encontrar IgG e IgA anti-*Strongyloides stercoralis* (Mota-Ferrerira et al., 2009). La ventaja de este método es que ofrece la posibilidad de obtener un resultado cuantitativo con el título de anticuerpos, pero requiere que la lleve a cabo personal especializado (Levenhaghen et al., 2014).

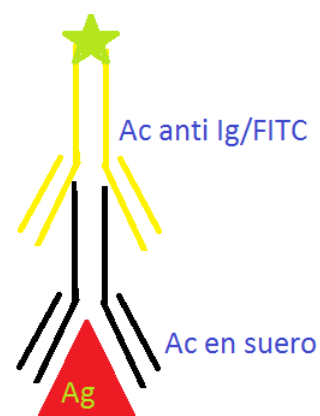


Figura 4: Representación gráfica de IFAT

2. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay): esta prueba es muy útil y se emplea mucho en infecciones y parasitosis. Es capaz de detectar anticuerpos, inmunocomplejos y/o antígenos en diversas muestras biológicas. Se añade la muestra y el anticuerpo de detección conjugado en la placa y después se mide la absorbancia. Se considera una técnica inmunológica superior al ser simple, automatizable y a la disponibilidad de reactivos. Su mayor problema es la posibilidad de reactividad cruzada con otros parásitos. En la estrongiloidiasis se usa sobre todo con el fin de detectar anticuerpos IgG. La sensibilidad varía según los estudios desde el 88,5% en una serie del estudio Boscolo et al., (2007) hasta un 48,1% en otra del mismo estudio, sin embargo la especificidad es más constante variando entre el 98,8% y el 100% (Boscolo et al., 2007). La parte crucial es la preparación de los antígenos, para obtener los fragmentos proteicos se emplean diferentes técnicas que buscan permitir la mayor especificidad posible (Levenhaghen et al., 2014).

Una prueba que permite la diferenciación entre la infección aguda y la infección crónica o la existencia de un contacto previo es la ELISA-Avidez. La avidéz aumenta cuando pasa tiempo desde el contacto, esto es útil ya que no sirve sólo con detectar IgG anti-*S. stercoralis* porque incluso tras el tratamiento los niveles se mantienen por encima de lo normal.

Un problema de estas pruebas es la posibilidad de falsos negativos, sobre todo en población con inmunosupresión que además son los que sufren mayor peligro de desarrollar formas graves de la infección. Por ello existe la necesidad de desarrollar pruebas específicas y sensibles para esta parasitosis, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos o candidatos a tratamiento inmunosupresor. También hay diferencia en la reacción inmune que presentan pacientes viajeros con respecto a otros grupos de población (Levenhaghen et al., 2014).

3. IB (Inmunoblotting): Es también una prueba útil para el diagnóstico de estrongiloidiasis que ha demostrado elevadas sensibilidad y especificidad. Para esta prueba se requiere un antígeno o proteína recombinante que se coloca en un gel SDS-PAGE y después se transfieren las bandas a una membrana de nitrocelulosa, se hacen tiras y sobre estas tiras se añade suero, entonces la reacción muestra si en el suero hay Ig contra ese antígeno o proteína mediante anticuerpos anti-Ig humana marcados (Levenhaghen et al., 2014).

Aunque tiene buena sensibilidad y especificidad, es costosa de realizar y conlleva mucho tiempo para la realización y el análisis, por lo tanto se emplea más bien como prueba de confirmación cuando hay positivo en otros test serológicos. La reactividad varía según muchos factores: diversidad inmunogénica del parásito, protocolos de preparación del antígeno o población estudiada (Levenhaghen et al., 2014). Hay estudios que hablan de reactividad reducida en suero de pacientes inmunodeprimidos, y con ello una menor respuesta inmune en casos de estrongiloidiasis diseminada (Sudré et al., 2007). Por este motivo, se deberían llevar a cabo estudios que ayuden a determinar el perfil de anticuerpos específicos en pacientes con inmunosupresión o que se encuentran fuera de áreas endémicas (Levenhaghen et al., 2014).

4. LIPS (sistema de inmunoprecipitación de luciferasa): Esta técnica usa antígenos recombinantes obtenidos del cADN del parásito o con antígenos inmunorreactivos del mismo. Es una técnica relativamente sencilla y que se puede hacer a gran escala, con buena eficiencia diagnóstica. Puede detectar directamente anticuerpos específicos y generar un perfil cuantitativo de respuesta mediada por anticuerpos. Ha demostrado buena sensibilidad y especificidad aunque es una prueba de origen reciente. Carece hasta el momento de casos de reactividad cruzada y además es útil en el seguimiento tras el tratamiento. El modo QLIPS que permite realizar el test en 15 minutos supondría un gran avance en las pruebas diagnósticas de infección por *S. stercoralis*. Aunque de momento su disponibilidad es muy reducida y además se requiere un análisis más completo de la metodología a fin de conseguir diferenciar crónicos de agudos tratados. Por último también necesita estandarizarse en casos con inmunidad alterada (Levenhaghen et al., 2014).

5. Dipstick assay: Van Doorn et al., (2007) desarrolló un método mediante tiras reactivas que mostró validez para el diagnóstico pero que requiere el uso de larvas para su preparación por lo que depende de pacientes que expulsan larvas. Además aún hay que demostrar su reproducibilidad y ver en nuevos

estudios cómo funciona a mayor escala y si realmente es económicamente viable (Levenhaghen et al., 2014).

-Otro grupo de técnicas de última generación para el diagnóstico de parasitosis son las técnicas basadas en la biología molecular:

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa): Esta técnica, permite la identificar secuencias de ADN mediante la amplificación de una región seleccionada del genoma de la que se conoce la secuencia de nucleótidos. Se basa en la capacidad de la ADN-polimerasa para replicar ADN siguiendo unos ciclos en los que se alternan altas y bajas temperaturas para que se repita varias veces la replicación obteniéndose así una mayor cantidad de cadenas de ADN (Wikipedia. 2015).

Para llevar a cabo esta técnica se requieren una serie de componentes:

- Buffer de amplificación: suelen contener Tris y KCl.
- $MgCl_2$: influye mucho en la especificidad y el rendimiento de la reacción. Los iones Mg^{2+} actúan como cofactores de la polimerasa. Su concentración óptima depende del resto de componente. Tanto un exceso como una carencia limitan la utilidad de la prueba.
- Cebadores/primers: son oligonucleótidos iniciadores de entre 18 y 22 bases idealmente. Se utilizan dos en cada PCR, y ambos deben tener una temperatura de desnaturalización similar. La relación bases púricas/pirimidínicas debe ser 1:1 aproximadamente y deben comenzar y terminar por 1-2 bases púricas.
- dNTPs: son el sustrato del nuevo ADN, los diferentes nucleótidos que usa la polimerasa para copiar el fragmento de ADN que se va a amplificar. Su concentración va relacionada con la del $MgCl_2$.
- DNA polimerasa: son las enzimas que permiten la amplificación. Algunas son también transferasas. La más empleada es la Taq polimerasa de la especie *Thermus aquaticus*. Su actividad depende de la concentración de dNTPs, de Mg^{2+} y de otros iones.
- DNA molde: es el ADN a partir del cual se quiere copiar un fragmento.
- Termociclador: aparato encargado de mantener las temperaturas adecuadas en cada momento (Wikipedia. 2015).

La realización de copias desde el ADN molde se lleva a cabo en **ciclos de amplificación (Figura 5)**: Hay un primer calentamiento de unos 5-10 minutos en los que se activa la polimerasa y después se producen en cada ciclo de amplificación, 3 pasos que se repiten (desnaturalización, alineamiento y extensión de la cadena) (Wikipedia. 2015).

-Desnaturalización: es el primer paso del ciclo de amplificación y en él se separan las dos cadenas que conforman las moléculas de ADN, suele hacerse mediante calor (94°C-95°C).

-Alineamiento: a continuación el cebador o primer se une a su secuencia complementaria para lo que se requiere una temperatura más baja (45°C-65°C), dichos cebadores serán los límites de la molécula amplificada.

-Extensión de la cadena: aquí actúa la DNA polimerasa que toma el molde y sintetiza desde el cebador la cadena complementaria. Para ello la temperatura es de 72°C, ya que es a la que la ADN polimerasa presenta su mayor actividad.

-Elongación final: etapa única tras repetir las 3 anteriores el número de veces que sea necesario en la cual se mantiene una temperatura de unos 70-74°C durante 5-15 minutos para asegurar que cualquier ADN de cadena simple restante se replique.

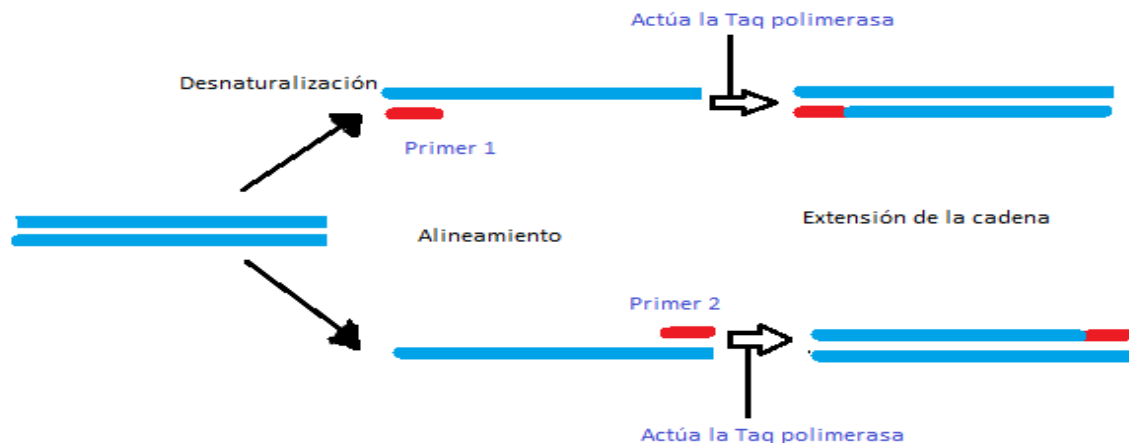


Figura 5: Representación de un ciclo de amplificación de un fragmento de ADN en PCR

Tras todos estos pasos, se dejan las muestras a 4-15°C para conservarlas a corto plazo

La verificación de que la PCR ha generado el fragmento se lleva a cabo mediante una **electroforesis** en la cual se separan los fragmentos de ADN de acuerdo con su longitud. Se suele emplear el gel de agarosa para fragmentos grandes y la acrilamida para los más pequeños (Wikipedia. 2015).

Lo mencionado anteriormente haría referencia a la PCR simple, pero además existen otros tipos de PCR:

a. Anidada: muy sensible. En esta técnica, el producto de una amplificación se emplea como molde y sobre él, se realiza una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de esta primera secuencia. Tiene la ventaja de aumentar la sensibilidad y la especificidad, esta última ya que al amplificar una región de la amplificación, los primers o cebadores sólo se unirán a un sitio dentro de la molécula y el resultado dará una banda únicamente. Su principal desventaja es la imposibilidad de cuantificar a partir de ella (Wikipedia. 2015).

b. Múltiple: en esta PCR se amplifican varias secuencias en una reacción mediante el uso de varios pares de primers o cebadores y obteniendo varios productos cuyo resultado son varias bandas en la electroforesis (Wikipedia. 2015).

c. In situ: se hace sobre preparaciones en un portaobjetos, así los productos pueden visualizarse sobre el propio sitio de amplificación. Primero se

amplifica el ADN diana y luego se detecta con hibridación con sondas de ADN/ARN (Wikipedia. 2015).

d. Con transcriptasa inversa: el molde inicial es ARN. En esta PCR se necesitan dos tipos de cebadores, unos “antisentido” que inician la reacción de la transcriptasa inversa y otros en “sentido” que realiza la duplicación de ADNc. También requiere una polimerasa especial (Wikipedia. 2015).

e. A tiempo real: permite la cuantificación de ADN o ARN amplificado en cada momento para lo que se usa una sonda unida a dos fluorocromos que hibrida entre los dos primers. Si la sonda está intacta hay transferencia de energía por fluorescencia (FRET) que no se produce cuando está dañada y los fluorocromos distantes lo que permite monitorizar el cambio de patrón de fluorescencia y deducir a partir de él el nivel de amplificación (Wikipedia. 2015).

En lo que respecta al diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*, la PCR es una prueba que ofrece la posibilidad de diferenciar esta especie de otras de *Strongyloides*. En el diagnóstico de estrongiloidiasis, se ha empleado la PCR que intenta detectar ADN del parásito en heces con PCR simple y anidada. Se postula como una técnica que será muy útil en el futuro para el diagnóstico de esta parasitosis (Levenhaghen et al., 2014).

En el trabajo de Moghadassani et al. (2011) se llevó a cabo un estudio con PCR simple y PCR anidada en muestras a las que se les había realizado también el cultivo en agar que se consideraba el patrón de positivos y negativos entre los pacientes estudiados. La PCR simple demostró una sensibilidad mayor que la anidada y también obtuvo más positivos que el cultivo. Por el contrario, la sensibilidad de la PCR anidada fue tan sólo del 75% respecto al cultivo. Esto puede deberse a que el fragmento amplificado era menor o a la presencia (común) de inhibidores de la PCR en las heces que influye más en los resultados si hay poca concentración de ADN del parásito en las muestras.

La mayor dificultad que presenta esta prueba es la extracción de ADN desde las larvas debido a su cutícula protectora. Por ello se han desarrollado métodos para facilitar esta extracción. También se ha observado que si se añade seroalbúmina de bovino se neutraliza en parte la acción de los inhibidores presentes en las heces. Otro problema es que sólo está disponible en países industrializados, no en aquellos países que más lo necesitan debido a que la infección por *S. stercoralis* es endémica (Levenhaghen et al., 2014)

Por último, existen otro tipo de pruebas que también pueden ser útiles para el diagnóstico de estrongiloidiasis:

Enterotest: cordel con una lámina de gelatina que se coloca en el intestino delgado y se extrae tras unas 4 horas para examinarlo. Tiene una buena sensibilidad y puede ayudar para infecciones por giardia o uncinarias.

Examen directo en lavado bronquial, esputo, vómito, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo u orina en el que se pueden observar larvas en las formas de enfermedad diseminada.

Endoscopia: la endoscopia alta puede revelar la existencia de gastritis o duodenitis con ulceración y sangrado. En el aspirado duodenal se pueden llegar a observar larvas lo que ofrece una sensibilidad de hasta el 90%.

Radiología: la infección puede causar diversas alteraciones en el tracto digestivo que se pueden observar en la radiografía (Arango, 1998).

Tratamiento

La estrongiloidiasis es una parasitosis difícil de tratar por la resistencia de las larvas infectantes a los antiparasitarios. Hay dos grupos de fármacos que son eficaces contra el *S. stercoralis*: Los benzimidazoles y la ivermectina.

Dentro del primer grupo se encuentra el tiabendazol, que fue el primero en usarse y siempre ha sido el tratamiento de elección. La dosis normal es de 25-50 mg/kg/12h (con un máximo de 3g/día) durante 2-3 (Igual et al., 2007) ó 7 días (Pardo et al., 2003). Es un fármaco con buena tasa de curación pero que da problemas a causa de su toxicidad, puede causar: náuseas, vértigo, prurito, somnolencia, delirios, cefalea (Igual et al., 2007), diarrea y/o mareo (Pardo et al., 2003). Otro fármaco que se emplea de los pertenecientes a este grupo y que se tolera mucho mejor es el albendazol, a dosis de 400mg/12h (Igual et al., 2007) ó 400 mg/24h (Pardo et al., 2003) durante 3 días. Las tasas de curación de este fármaco son además del 90% (Igual et al., 2007) (42%-100% según los estudios) (Pardo et al., 2003).

La ivermectina es el fármaco que más activo se ha mostrado entre los que se han estudiado. Es de estructura similar a macrólidos y su tasa de curación es próxima al 100% en estrongiloidiasis no diseminadas (Igual et al., 2007).

En el estudio de Igual et al. (2007) se compara la eficacia de usar ivermectina a dosis de 0,2 mg /kg/día en una dosis, en dos dosis y usar tiabendazol a dosis normales. Este estudio nos revela que el tratamiento con ivermectina en dos dosis fue el más eficaz. Zaha, Hirata, Kinjo, y Saito (2000) hace una comparación entre usar albendazol a 400mg/día 3 días e ivermectina a 6mg/día en monodosis. La cura coprológica se observó en el 77,4% del primer grupo y en el 97% del segundo. Por tanto podemos decir que la ivermectina es la que mayor efecto antihelmíntico tiene además de una menor toxicidad. Aunque a pesar de ello las dificultades que supone su adquisición y la elevada disponibilidad del albendazol, provocan que éste sea normalmente el fármaco que se emplea como primera vía de tratamiento (Igual et al., 2007).

Las pautas recomendadas en función de la situación clínica pueden ser:

1. Larva currens y estrongiloidiasis crónica no complicada: albendazol 400mg/12h por 7 días o ivermectina 0,200mg/kg/día por 2 días.
2. Inmunodeprimidos sin eosinofilia: albendazol 400mg/12h por 7 días e ivermectina 0,200mg/kg/día por 2 días.
3. Estrongiloidiasis diseminada: Terapia combinada hasta que haya evidencia de que se ha erradicado al parásito (Igual et al., 2007).

Cabe añadir, que en casos de hiperinfección, la utilización de ivermectina subcutánea a dosis de 6 mg durante dos días consecutivos tiene buenos resultados sin complicaciones salvo en la zona de punción (Pardo et al., 2003).

OBJETIVO

Tras la revisión de los artículos citados a lo largo del trabajo, se observa la coincidencia de opiniones en que la infección producida por *S. stercoralis* se encuentra ampliamente infradiagnosticada. Por este motivo es muy importante el desarrollo de técnicas de diagnóstico que posean una alta sensibilidad. Se conoce que las técnicas más realizadas son la visión directa y la concentración, ambas son pruebas con baja sensibilidad. Por tanto habría que realizar otros exámenes en los pacientes con sospecha de parasitosis, especialmente en zonas endémicas y en pacientes inmunodeprimidos o candidatos a tratamiento inmunosupresor.

Existen varias pruebas novedosas que han demostrado mayor sensibilidad aunque muchas de ellas no cuentan con los suficientes estudios como para estandarizarlas.

Tras revisar artículos como el de Moghadassani et al. (2011), con este trabajo se quiso comprobar si realmente la PCR anidada era una prueba que no ofreciese mejora con respecto a los métodos tradicionales. Se llevó a cabo esta para ponerla a prueba puesto que de la PCR simple ya se conocía las elevadas sensibilidad y especificidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

-Para la búsqueda de información acerca de los aspectos generales y el diagnóstico de la infección por *S. stercoralis* se han realizado búsquedas usando las palabras clave “*Strongyloides stercoralis*”, “strongiloidiasis”, “strongyloidiasis”, “diagnosis”, “risk factors”, y “PCR” en diferentes combinaciones. Las búsquedas se han llevado a cabo en PubMed y en Google Académico, limitándolas a artículos de los últimos 20 años. Además también se visitó la página de Centers for Disease Control and Prevention, buscando en ella la información referente a *S. stercoralis*. Para la información teórica acerca de la técnica de la PCR se ha obtenido la información de la página Wikipedia tras comprobar su veracidad comprobando sus referencias bibliográficas.

-Selección de muestras: se eligieron 80 muestras al azar de ADN extraído de un total de 600 recogidas en Guinea Ecuatorial y a las cuáles se les había realizado un completo examen microscópico por parte del Dr. Antonio Clavel, catedrático de parasitología de la facultad de Medicina universidad de Zaragoza, tras realizar una concentración. Además de cada uno de los pacientes se recogieron una serie de datos epidemiológicos y clínicos. Las muestras se dividieron en 300 procedentes de la isla de Byoko de las cuales se emplearon 40, y otras 300 procedentes del continente de las que se usaron otras 40.

-Técnica PCR anidada: para la realización de esta técnica se ha empleado el siguiente método (Niforoushan et al., 2007):

PCR 1: Un volumen total de 50µl que contenía:

a) 49µl de mix: 5µl de Buffer, 2,5µl de disolución de MgCl₂ a concentración 50mM, 0,4 µl de dNTPs a concentración 25mM, 0,5 µl de cada uno de los dos primers o cebadores (SS-FO: 5'-ATC CTT CCA ATC GCT GTT GT -3' y SS-RO: 5'-TTT CGT GAT GGG CTA ATT CC-3') a concentraciones de 10 µM, 2,5 U de Taq polimerasa.

b) A esta mix se le añadió 1µl de ADN templado.

A continuación se colocaron las muestras en el termociclador con el siguiente programa:

5 minutos a 94°C.

35 ciclos de: a) 94°C durante 45s.

b) 58°C durante 1 minuto.

c) 72°C durante 1 minuto.

5 minutos de extensión a 72°C.

PCR 2: un volumen total de 50 µl con 49 µl de una mix similar en la que se cambiaron los primers o cebadores, que en este caso eran SS-FI: 5'-GTA ACA AGG TTT TCG TAG GTC A-3' y SS-RI: 5'-ATT TAG TTT CTTT TTC CTC CGC TT-3'. Por último en lugar de completar los 50 µl con ADN, se añadió 1 µl del producto de la primera PCR.

A continuación se colocaron las muestras en el termociclador con el siguiente programa:

5 minutos a 94°C.

30 ciclos de: a) 94°C durante 45s.

b) 60°C durante 45 segundos.

c) 72°C durante 1 minuto.

5 minutos de extensión a 72°C.

Electroforesis: realizada en un gel de agarosa con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Se llevó a cabo durante 1h 15 minutos a 100V aproximadamente. Por último se usó la lámpara ultravioleta para visualizar los resultados.

RESULTADOS

A los pacientes de los que procedían las muestras que han sido estudiadas en este trabajo se les hacía una serie de preguntas y una serie de pruebas diagnósticas para determinar algunos datos epidemiológicos y de salud de los mismos.

Con estos datos, se determinó que el grupo de pacientes de los que se estaban estudiando las muestras de ADN procedente de las heces estaba conformado por 63 mujeres y 17 hombres. En lo referente a edades contábamos con 4 individuos que se incluyeron en el grupo denominado niños (0-14 años) y 76 en el grupo de los adultos (15 años en adelante) (**tabla 1**).

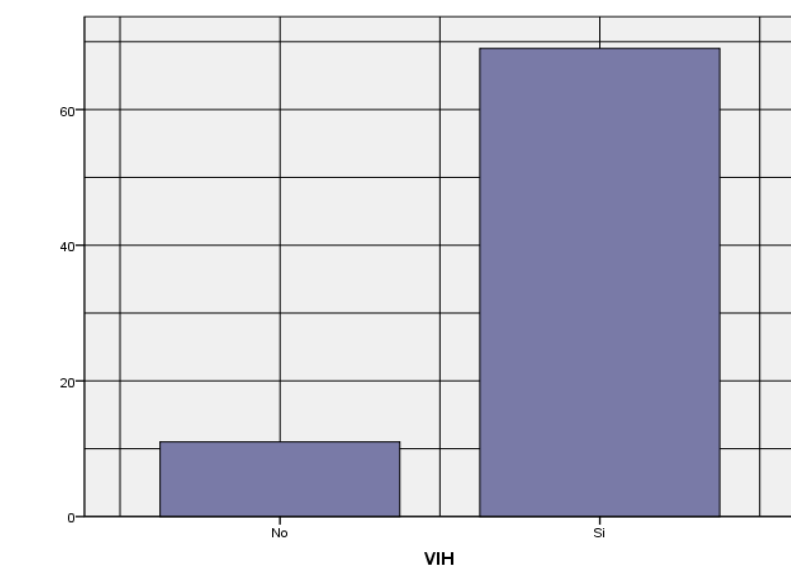
Las muestras de ADN, procedían de muestras de heces estudiadas al microscopio para un estudio en el que se valoraba la presencia o no de múltiples

parásitos en pacientes infectados por el VIH en su gran mayoría. Así del total de 80 pacientes seleccionados al azar para este trabajo, encontramos 69 pacientes VIH+ y tan sólo 11 VIH- (**gráfico 1**).

	GRUPO DE EDAD			
	Adulto	Niño	Total	
SEXO	Mujer	61	2	63
	Hombre	15	2	17
	Total	76	4	80

***Tabla 1.** Distribución por edad y sexo de los pacientes de los que proceden las muestras estudiadas.*

Entre los 69 pacientes que se encontraban infectados por el VIH también se ha realizado distinción según si recibían o no tratamiento antirretroviral contra la infección y también se han dividido en función de los recuentos de linfocitos CD4 en 3 grupos para valorar el estado de su sistema inmune. Así en el recuento total, teníamos un total de 31 pacientes que no se consideraban inmunodeprimidos (recuento de linfocitos CD4 $>500/\text{mm}^3$), 12 se encontraban con la inmunidad moderadamente deprimida (recuento de linfocitos CD4 $>350/\text{mm}^3$ y $<500/\text{mm}^3$), y por último un grupo de 26 individuos en los que existía un importante grado de inmunosupresión (recuento de linfocitos CD4 $<350/\text{mm}^3$) (**gráfico 2**).



***Gráfico 1.** Recuento de pacientes VIH +*

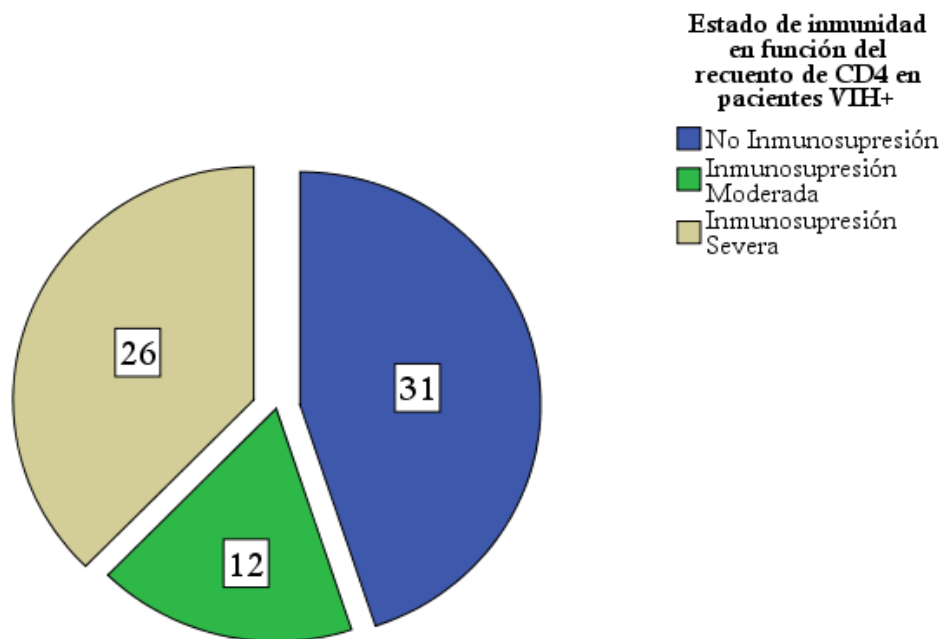


Gráfico 2. Recuento estratificado de inmunosupresión entre los infectados por VIH.

Además como se representa en el **gráfico 3**, también se recogió información sobre si los pacientes que estaban infectados por el VIH recibían tratamiento. Así de los 69 infectados tan sólo 33 estaban en ese momento recibiendo tratamiento antirretroviral, mientras que 36, permanecían sin ningún tratamiento para dicha infección. El reparto según grado de inmunosupresión era el siguiente. En inmunodeprimidos severos, 13 se estaban tratando y 13 no, en moderados 5 se trataban y 7 no, y por último en el grupo de infectados a los que no se consideraba inmunodeprimidos, 16 no recibían tratamiento mientras que 15 sí que lo hacían.

Otro parámetro acerca del que se recopiló información fue si los pacientes presentaban en el momento de la recogida de muestras alguna sintomatología digestiva agrupando en 3 categorías: diarrea, estreñimiento u otros síntomas. 13 pacientes padecían diarrea en ese momento, 19 estaban estreñidos y hasta 36 padecían otros síntomas. En las **tablas 2 y 3** se recoge la correlación entre las diferentes sintomatologías ya que pertenecer a la 3ª categoría no era un criterio de exclusión de la primera ni de la segunda.

También debido a la diferencia de prevalencias según el medio en el que vivan los pacientes, se tomó en cuenta la procedencia de los individuos de los cuáles provenían las muestras. Como se comentaba en material y métodos, el 50% de las muestras pertenecía a pacientes que vivían en la isla de Byoko mientras que el otro 50% eran de pacientes procedentes del continente.

Además de este dato geográfico también se tuvo en cuenta la zona en la que habitaban los pacientes estudiados, así se dividieron en 3 grupos: los que habitaban

en un medio rural, los que habitaban en el casco urbano de las ciudades y los que vivían en el extrarradio o cinturón de las mismas (**gráfico 4**).

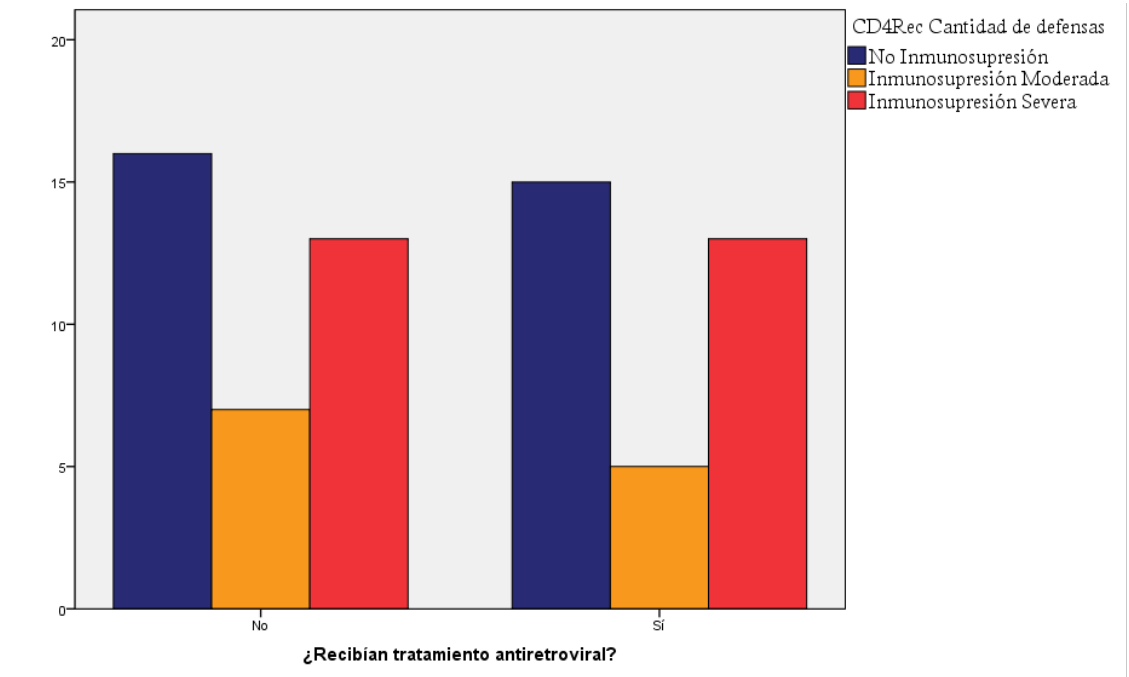


Gráfico 3. Recuento de pacientes que recibían tratamiento según grado de inmunosupresión

		Otros síntomas intestinales		
		No	Sí	Total
Estreñimiento	No	36	25	61
	Sí	8	11	19
	Total	44	36	80

Tablas 2. Presencia o no de estreñimiento y otros síntomas.

		Otros síntomas intestinales		
		No	Sí	Total
Diarrea	No	40	27	67
	Sí	4	9	13
	Total	44	36	80

Tablas 3. Presencia o no de diarrea y otros síntomas.

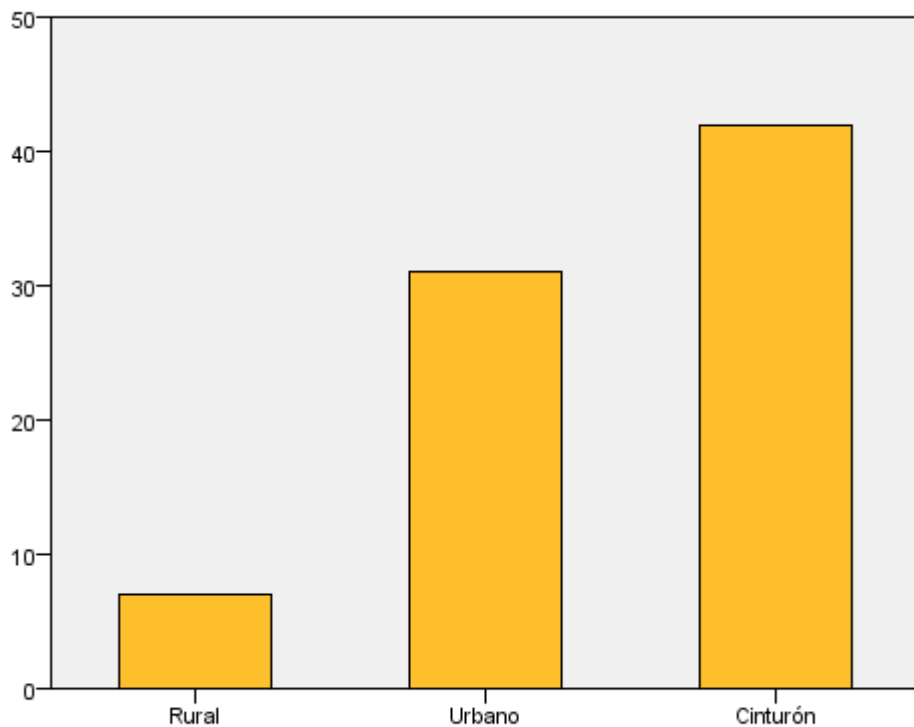


Gráfico 4. Reparto por zona en la que habita el paciente.

En total, 7 paciente vivían en medio rural, 31 en medio urbano y 42 pertenecían al extrarradio de las ciudades.

En lo que respecta a los resultados de la prueba que llevamos a cabo, se realizó la PCR anidada a las 80 muestras que se han comentado desconociendo a lo largo del proceso, cuál había sido el resultado que se había obtenido de llevar a cabo la visión directa de las mismas. Así el recuento final tras ser todas examinadas fue el siguiente: 4 resultados positivos y 76 resultados negativos (**gráfico 5**).

Tras realizar esta prueba a todas las muestras y hacer el recuento de positivos y negativos se consultaron los resultados que se habían obtenido al llevar a cabo la técnica de concentración para *S. stercoralis* en estas muestras, una prueba que como ya se ha comentado a lo largo del trabajo tiene una baja sensibilidad, un 50% aproximadamente ya que ésta, sólo se había llevado a cabo en una sola muestra por paciente.

El resultado fue el siguiente, de las 80 muestras, 21 eran positivas para el parásito, mientras que 59 eran negativas (**gráfico 6**). Por tanto se observó una diferencia significativa entre los resultados de ambas pruebas, al obtenerse una mayor cantidad de positivos con la prueba de baja sensibilidad. Así según la PCR, la prevalencia sería de un 5% mientras que según la visión directa esta cifra ascendería hasta un 26%.

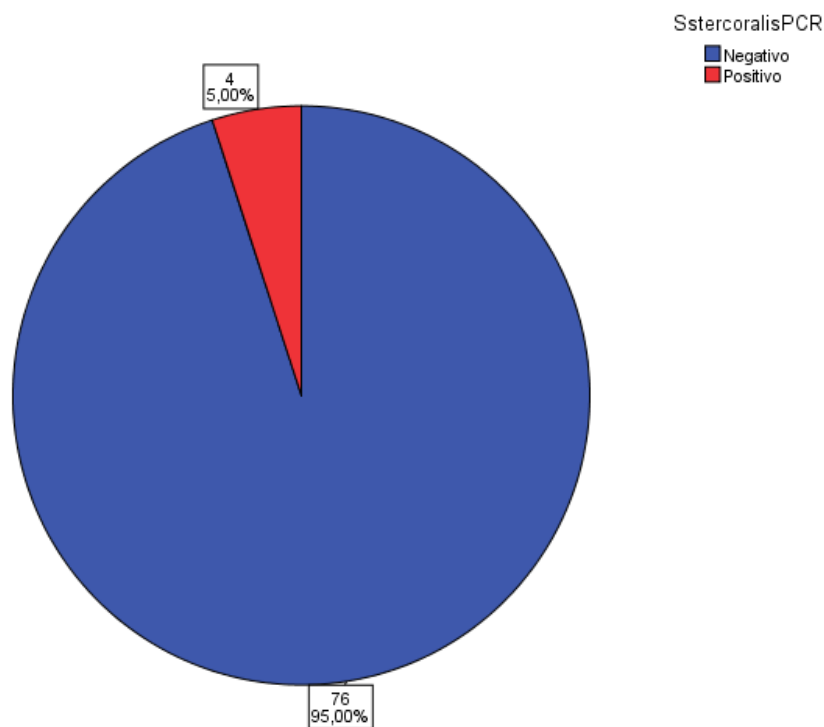


Gráfico 5. Resultados PCR anidada para *S. stercoralis*.

Dada la baja sensibilidad que se le presupone a la concentración se decidió tomar como infectados a todos aquellos individuos que habían tenido al menos un resultado positivo en alguna de las dos pruebas que se llevaron a cabo para el estudio de la parasitosis.

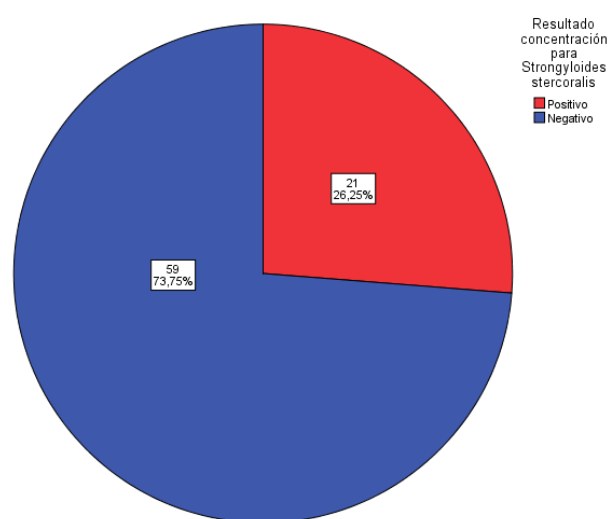


Gráfico 6. Resultados visión directa para *S. stercoralis*.

Esta decisión se tomó por el hecho de que no existía ninguna de las dos pruebas que se pudiera considerar como el Gold Standard para la parasitosis por *S. stercoralis*. En la **tabla 4** podemos observar la relación que existía entre dichas pruebas.

		Concentración		Total
		Positivo	Negativo	
PCR Anidada	Positivo	2	2	4
	Negativo	19	57	76
	Total	21	59	80

Tabla 4. Tabla de contingencia para PCR y visión directa

De este modo, estimamos que el total de enfermos es 23. Dos que eran positivos para ambas pruebas, 19 que sólo fueron positivos para la concentración y otros 2 que fueron positivos tan sólo para la PCR. No se hicieron cálculos de sensibilidad y especificidad absolutas de cada una de las pruebas ya que al no haber un Gold Standard respecto al cual comparar los resultados obtenidos, no era posible obtener unos resultados que se aproximasen a la realidad. Al calcular la sensibilidad relativa, el resultado fue que la PCR tiene una sensibilidad relativa del 19% respecto a la concentración.

Dado que al recoger las muestras se habían recogido los datos sobre los pacientes a los que pertenecían las pruebas que se han comentado anteriormente: edad, sexo, infección por VIH, inmunosupresión, clínica (diarrea, estreñimiento u otros síntomas) y zona de procedencia; se decidió llevar a cabo un estudio estadístico para comprobar si alguno de estos factores se podía asociar de una forma significativa a la infección por *S.stercoralis*. En la **tabla 5** se recoge un resumen de las diferencias de frecuencia de los factores y datos estudiados en los infectados y en los no infectados.

Las frecuencias de infección detectada por al menos una prueba eran mayores en: adultos respecto a niños, hombres respecto a mujeres, los que vivían en el casco urbano respecto a los del extrarradio y los pueblos y los que presentaban diarrea. Se encontró menos tasa de infección en los infectados por VIH que en los no infectados, y dentro de ellos, la mayor tasa en aquellos que no estaban inmunodeprimidos, también había más prevalencia entre aquellos pacientes que no presentaban estreñimiento ni síntomas distintos a diarrea o estreñimiento.

	TOTAL	Infectados por <i>S. stercoralis</i>	
		Sí	No
Grupo de edad:			
Niño	4	1 (25%)	3 (75%)
Adulto	76	22 (28,9%)	54 (71,1%)
Sexo:			
Hombre	17	5 (29,4%)	12 (71,6%)
Mujer	63	18 (28,6%)	45 (71,4%)
Zona			
Rural	7	2 (28,6%)	5 (71,4%)
Casco urbano	31	11 (35,5%)	20 (64,5%)
Extrarradio	42	10 (23,8%)	32 (76,2%)
Diarrea			
Sí	13	4 (30,8%)	9 (69,2%)
No	67	19 (28,4%)	48 (71,6%)
Estreñimiento			
Sí	19	1 (5,3%)	18 (94,7%)
No	61	22 (36,1%)	39 (63,9%)
Otros síntomas			
Sí	36	8 (22,2 %)	28 (77,8%)
No	44	15 (34,1%)	29 (65,9%)
Infección por VIH			
+	69	19 (27,5%)	50 (72,5%)
-	11	4 (36,4%)	7 (63,6%)
Inmunosupresión (VIH+):			
No	31	9 (29,9%)	22 (71,0%)
Moderada	12	3 (25%)	9 (75%)
Severa	26	7 (26,9%)	19 (73,1%)

Tabla 5. Relación entre datos recogidos acerca de los pacientes y presencia o ausencia de infección.

Pero a pesar de estas diferencias halladas, al realizar los estudios estadísticos pertinentes, ninguna de las variables estudiadas mostraba una asociación representativa para presentar la infección en la población estudiada ya que no se encontraron relaciones significativas ($p > 0,05$ para todos los factores).

CONCLUSIONES

La infección por *Strongyloides stercoralis* es una enfermedad que en la actualidad se encuentra muy infradiagnosticada. Este hecho es muy importante ya que existen muchos individuos que debido a que la parasitosis no les ha causado una clínica significativa no han consultado ni se han sometido a pruebas

diagnósticas por lo que aparentemente están sanos y se les puede considerar como tal, lo que sería un error pues realmente se encuentran parasitados, algo que hay que tener muy en cuenta porque podría acabar causándoles cuadros muy graves e incluso mortales en caso de producirse una alteración en su inmunidad.

La prevalencia real de la enfermedad es una incógnita en la actualidad, y esto se debe en gran parte a la escasez de estudios que realizados con el fin de conocer datos epidemiológicos de la infección y también a que los estudios y trabajos que hay publicados, en muchas ocasiones se han llevado a cabo empleando pruebas de baja sensibilidad o en las que realmente se estaba buscando otro parásito. Por lo tanto sería interesante llevar a cabo estudios centrados en esta patología y empleando pruebas de alta sensibilidad, sobre todo en zonas endémicas.

El principal problema que provoca la parasitosis por *Strongyloides stercoralis* es que los hospedadores pueden debutar con un cuadro de estrongiloidiasis grave, ya sea por hiperinfección o por estrongiloidiasis diseminada, si hay alguna circunstancia, enfermedad o tratamiento que provoque una disminución de la respuesta inmune del tipo Th2 de dichos sujetos.

Además la probabilidad de que el paciente sufra una forma grave de estrongiloidiasis como primera manifestación se ve incrementada por el hecho de que el parásito puede permanecer dentro del hospedador durante un largo periodo de tiempo causando una infección latente que puede no dar ninguna clínica hasta el momento en el que se ve comprometida la inmunidad.

En la actualidad se conocen varios factores concretos que pueden facilitar la aparición de formas clínicas de gravedad como son el alcoholismo, el tratamiento con inmunosupresores, infección por el virus HTLV-1, trasplante de órganos y algunos otros.

Para evitar la aparición de este tipo de presentaciones de la infección en estos grupos, y con ello disminuir también el número de infecciones que terminan siendo letales, sería muy útil el realizar pruebas diagnósticas que nos sirvieran de screening en aquellos pacientes considerados de alto riesgo de sufrir una forma grave de enfermedad, especialmente en los países en los que la estrongiloidiasis es una enfermedad endémica. De este modo, habría que realizar pruebas de alta sensibilidad a los siguientes grupos de pacientes:

- Aquellos a los que se les va a administrar tratamiento con corticosteroides u otros fármacos inmunosupresores.
- Infectados por el virus HTLV-1.
- Candidatos a trasplante de órganos.

- Con patología tumoral o de otro tipo que ponga en compromiso su respuesta inmune de tipo Th2.

También se debería estudiar si hay infección por este helminto en pacientes que presenten eosinofalias de origen desconocido, puesto que es una de las manifestaciones analíticas de la infección. Por último también habría que realizar estudios para descartar la parasitosis en aquellos individuos que procedan de zonas endémicas o tengan antecedentes de viajes recientes a estas zonas.

Cabe mencionar también la necesidad de concienciación acerca de la importancia de esta infección en los países del mundo occidental, ya que en muchos de ellos se considera como una enfermedad exclusiva de otras zonas del mundo cuando no es así, pues debido a los fenómenos migratorios y a los muchos viajes que se realizan a países considerados endémicos hay casos descritos en todo el mundo. Además hay países como España o Alemania en los que incluso se han encontrado casos autóctonos, que contrajeron la enfermedad sin salir del país.

Un importante problema a la hora de conseguir diagnosticar la existencia del parásito en el hospedador es que casi siempre que se sospecha esta patología, los exámenes que se llevan a cabo para confirmarla son de baja sensibilidad lo que provoca que muchos pacientes que realmente se encuentran enfermos sean catalogados como sanos. Se están llevando a cabo sobre todo exámenes directos y técnicas de concentración de las heces cuando para obtener resultados realmente válidos deberíamos sustituir estas pruebas por la PCR simple a ser posible o por el cultivo a ser posible o por el método de Baermann si no fuera así.

La biología molecular y las técnicas inmunológicas nos ofrecen una nueva dimensión en el diagnóstico y ya hay estudios que demuestran que la PCR simple puede ser una prueba aún más sensible que el cultivo en agar que era considerado el Gold Standard. Aunque también es cierto que esta técnica tiene unos costes y unos requerimientos que dificultan mucho el poder llevarla a cabo en muchos de los países endémicos.

Respecto a la prueba llevada a cabo en este estudio, la PCR anidada. Nuestros resultados no hacen más que confirmar que está bastante por debajo de la PCR simple en lo que respecta a sensibilidad como habíamos observado en trabajos anteriores. Al menos con la receta empleada es una prueba que está muy lejos de ser considerada de alta sensibilidad. Con los resultados que hemos obtenido en este estudio podemos aproximar que la sensibilidad de nuestra PCR anidada oscilaría alrededor del 10%, un valor realmente pobre si se tiene en cuenta que lo que se busca es el desarrollo de una prueba de alta sensibilidad que iguale o incluso mejore al cultivo en agar. Se considera que la baja sensibilidad de la prueba a lo largo del estudio puede deberse

entre otros factores a la existencia de inhibidores de la PCR en las heces y también a que la receta empleada para llevar a cabo la técnica se pueda perfeccionar todavía más cambiando las concentraciones de los diferentes reactivos.

Por tanto, podemos determinar que ante la sospecha de enfermedad o a modo de screening en los grupos de pacientes anteriormente mencionados, la técnica que mayor sensibilidad nos ofrecería sería la PCR simple y en caso de no poder llevarse a cabo habría que realizar un cultivo en agar o el método de Baermann, quedando al menos de momento, la PCR anidada fuera de estas pruebas diagnósticas que podríamos considerar de primera línea.

AGRADECIMIENTOS

Para concluir cabe hacer una mención al Departamento de Parasitología de la facultad de medicina de la Universidad de Zaragoza sin el cual, no se hubiera podido llevar a cabo este trabajo. Gracias a dicho departamento se ha podido tener acceso a los materiales y tecnología necesarios para realizar las técnicas y ha proporcionado información a la base de datos. De forma personal, agradecer especialmente al Dr. Clavel su supervisión del trabajo y su tutorización, así como los artículos proporcionados acerca del tema. También a la Dra Goñi por la ayuda y explicaciones prestadas para poder llevar a cabo la PCR.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alparo, I., y Tamayo, L. (2005). Síndrome de Loeffler: Presentación de un caso. *Cuadernos del Hospital de Clínicas*. 50(2), 69-73.
2. Arango, J.H. (1998). Strongyloides stercoralis. *Colombia médica*, Vol. 29(1), 32-42.
3. Bailey, K.E., Danylo, A., y Boggild, A.K. (2015). Chronic Larva Currens Following Tourist Travel to the Gambia and Southeast Asia Over 20 Years Ago. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, pii: 1203475415575247. (No impreso). doi: 10.1177/1203475415575247.
4. Barros, N., y Montes, M. (2014). Infection and Hyperinfection with Strongyloides stercoralis: Clinical Presentation, Etiology of Disease, and Treatment Options. *Current Tropical Medicine Reports*, 1, 223–228. doi: 10.1007/s40475-014-0030-y.
5. Boscolo, M., Gobbo, M., Mantovani, W., Degani, M., Anselmi, M., Monteiro, G.B., ... Bisoffi, Z. (2007) Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(2), 129-33.
6. Campo, L., Gutiérrez, L., y Cardona, J. (2014) Infección por *Strongyloides stercoralis*: metanálisis sobre evaluación de métodos diagnósticos convencionales (1980-2013). *Revista española de Salud Pública*, 88(5), 581-600.
7. Corti, M., Villafañe, M.F., Trione, N., Risso, D., Abuín, J.C., y Palmieri, O. (2011) Infección por Strongyloides stercoralis: estudio epidemiológico, clínico, diagnóstico y

- terapéutico en 30 pacientes. *Revista Chilena de Infectología*, 28(3), 217-22. doi: /S0716-10182011000300003.
8. Franceschi, G., Finali, M., Angulo, M., Amaro, E., Requena, I., y Blanco, Y. (2008). Comparación de técnicas para el diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*, 20(3), 289-297.
 9. Freitas, A. (2008) Virus linfotrópico T humano 1 (HTLV-1), strongyloidiasis y escabiosis. Infecciones y asociaciones a considerar. *Revista de Investigación Clínica*, 49(4),455-6.
 10. Hernández-Chavarría, F. (2001). *Strongyloides stercoralis*: Un parásito subestimado. *Parasitología al día*, 25(1-2), 40-49. doi: 10.4067/S0716-07202001000100008.
 11. Herrera, J., Marcos, L., Terashima, A., Alvarez, H., Samalvides, F., y Gotuzzo, E. (2006) Factors associated with strongyloides stercoralis infection in an endemic area in Peru. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 26(4), 357-62.
 12. Igual, R., y Domínguez, V. (2007). Estrongiloidiasis: epidemiología, manifestaciones clínicas y diagnóstico. Experiencia en una zona endémica: la comarca de La Safor (Valencia). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25 Supl 3, 38-44.
 13. Levenhagen, M.A., y Costa-Cruz, J.M.(2014). Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Acta Tropica*, 135:33-43. doi 10.1016/j.actatropica.2014.03.015.
 14. Khieu, V., Schär, F., Marti, H., Bless, P.J., Char, M.C., Muth, S., y Odermatt, P. (2014). Prevalence and risk factors of *Strongyloides stercoralis* in Takeo Province, Cambodia. *Parasits and Vectors*, 7, 221.
 15. Marcos, L.A., Terashima, A., Canales, M., y Gotuzzo, E. (2010). Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host. *Current infectious disease reports*, 13(1),35-46.
 16. Martínez, L., González-Carbajal, M., Cañete, R., y Almenarez, G. (2011). Diagnóstico y tratamiento de la estrongiloidosis. *Revista cubana de medicina militar*, 40(2), 157-167.
 17. Moghaddassani, H., Mirhendi, H., Hosseini, M., Rokni, M., Mowlavi, G.H., y Kia, E.B. (2011). Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection by PCR detection of specific DNA in human stool samples. *Iranian Journal of Parasitology*, 6,23–30.
 18. Mota-Ferreira, D.M.L., Gonçalves-Pires, M.RF., Ferreira-Júnior, A., Sopelete,M.C., Abdallah, V.O.S., y Costa-Cruz, J.M. (2009). Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. *Acta Tropica*, 109(2),103-7. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.09.023.
 19. Nilforoushan, M.R., Mirhendi, H., Rezaie, S., Rezaian, M., Meamar, A.R., y Kia, EB. (2012). A DNA-Based Identification of *Strongyloides stercoralis* Isolates from Iran. *Iranian Journal Of Public Health*, 36(3), 16-20.
 20. Pardo, G., Rodríguez, R., y Campillos, M.T. (2003). *Strongyloides stercoralis*: risk factors for disseminated infection. *Medicina Clínica (Barcelona)*, 121(17),662-4.
 21. Pérez, F., Núñez, F., Martín, N., Cabrera, R., y Rodríguez, E. (2012). Falla orgánica múltiple por estrongiloidiasis diseminada. Comunicación de un caso. *Revista chilena de infectología*, 29(3), 344-347. doi: 10.4067/S0716-10182012000300016.

22. Puthiyakunnon, S., Boddu, S., Li, Y., Zhou, X., Wang, C., Li, J., y Chen, X. (2014). Strongyloidiasis--an insight into its global prevalence and management. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8),e3018. doi: 10.1371/journal.pntd.0003018.
23. Ramírez Arriola, M.G., Hamido, N., Vázquez, J., Cabezas, T., y Salas, J.(2015). Eosinofilia e infiltrados pulmonares en paciente natural de Senegal. *Semergen*. doi: 10.1016/j.semerg.2014.10.020.
24. Reacción en cadena de la polimerasa. (s.f). En Wikipedia. Recuperado el 09 de Abril de 2015 de http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa.
25. Ribero, Z., Chourio, G., Díaz, I., Padilla, L., Zárate, M., y Ferrer, J.(2002). Comparación de cuatro técnicas de laboratorio para el diagnóstico de estrongiloidiasis. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(1), 68-73.
26. Rodríguez, D., Oltra, C., Igual, R., Parra, F., Martínez, J., Angel, C., Sanjuán, M., y Sanjuán, M.T. (1998). Treinta casos de estrongiloidiasis en un centro de atención primaria: características y posibles complicaciones. *Atención Primaria*, 21(5),271-4.
27. Schär, F., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Vounatsou, P., Marti H., y Odermatt, P. (2015) Occurrence of and risk factors for Strongyloides stercoralis infection in South-East Asia. *Acta Tropica* pii: S0001-706X(15)00056-X. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.03.008.
28. Schär, F., Trostorf, U., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., Vounatsou, P., y Odermatt, P. (2013). Strongyloides stercoralis: Global Distribution and Risk Factors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(7), e2288. doi: 10.1371/journal.pntd.0002288.
29. Strongyloides, Biology. Centers for disease control and prevention. Recuperado el 16 Abril 2015 de <http://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/biology.html>
30. Strongyloides, Epidemiology & Risk Factors. En Centers for disease control and prevention. Recuperado el 16 de Marzo de 2015 de <http://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/epi.html>.
31. Sudré, A.P., Siqueira, R.C., Barreto, M.G.M., Peralta, R.H.S., Macedo, H.W., y Peralta, J.M. (2007). Identification of a 26 kDa-protein fraction as na important antigenfor application in the immunodiagnosis os strongyloidiasis. *Parasitology research*, 101, 1117–1123.
32. Van Doorn, H. R., Koelewijn, R., Hofwegen, H., Gilis, H., Wetsteyn, J. C. F. M., Wismans, P. J., ... van Gool, T. (2007). Use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Dipstick Assay for Detection of Strongyloides stercoralis Infection in Humans . *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 438–442. doi:10.1128/JCM.01735-06.
33. Vonghachack, Y., Sayasone, S., Bouakhasith, D., Taisayavong, K., Akkavong, K., y Odermatt, P. (2015). Epidemiology of Strongyloides stercoralis on Mekong islands in southern Laos. *Acta Tropica*, 141(Pt B):289-94. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.09.016.
34. Zaha, O., Hirata, T., Kinjo, F., y Saito, A. (2000) Strongyloidiasis- progress in diagnosis and treatment. *Internal Medicine*, 39, 695-700.